

CHIMERIC GENE CODING FOR DROSOMICINE, VECTOR CONTAINING IT AND PRODUCTION OF TRANSGENIC PLANTS RESISTANT TO DISEASES

Patent number: WO9902717

Publication date: 1999-01-21

Inventor: DEROSE RICHARD (FR); FREYSSINET GEORGES (FR); HOFFMAN JULES (FR)

Applicant: RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR);; DEROSE RICHARD (FR);; FREYSSINET GEORGES (FR);; HOFFMAN JULES (FR)

Classification:

- **International:** C12N15/82; C12N15/62; C07K14/435; C12N15/12; A01H5/00; A01N63/00

- **european:** C07K14/00; C07K14/435A4D1; C12N15/82B; C12N15/82C8B6B

Application number: WO1998FR01462 19980708

Priority number(s): FR19970009115 19970711; FR19970009663 19970724

Also published as:

- EP0998575 (A1)
- US6465749 (B1)
- FR2766207 (A1)
- CA2296046 (A1)
- BR9815507 (A)

[more >>](#)

Cited documents:

- EP0507698
- FR2725992
- WO9603522
- EP0508909
- WO9119738

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract of WO9902717

The invention concerns a chimeric gene containing a DNA sequence coding for drosomicine, a vector containing the chimeric gene, and a method for transforming plants and the resulting transformed plants. The drosomicine produced by the plants provides them with resistance to diseases, in particular of fungal origin.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (use to)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/82, 15/62, C07K 14/435, C12N 15/12, A01H 5/00, A01N 63/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/02717 (43) Date de publication internationale: 21 janvier 1999 (21.01.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01462</p> <p>(22) Date de dépôt international: 8 juillet 1998 (08.07.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/09115 11 juillet 1997 (11.07.97) FR 97/09663 24 juillet 1997 (24.07.97) FR </p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR). </p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): DEROSE, Richard [US/FR]; 216, rue de Saint Cyr, F-69009 Lyon (FR). FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint Cyr au Mont d'Or (FR). HOFFMAN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR).</p> <p>(74) Mandataire: TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro – D.P.I., Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i> </p>	
<p>(54) Title: CHIMERIC GENE CODING FOR DROSOMICINE, VECTOR CONTAINING IT AND PRODUCTION OF TRANSGENIC PLANTS RESISTANT TO DISEASES</p> <p>(54) Titre: GENE CHIMERE CODANT POUR LA DROSOMICINE, VECTEUR LE CONTENANT ET OBTENTION DES PLANTES TRANSGENIQUES RESISTANTES AUX MALADIES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a chimeric gene containing a DNA sequence coding for drosomicine, a vector containing the chimeric gene, and a method for transforming plants and the resulting transformed plants. The drosomicine produced by the plants provides them with resistance to diseases, in particular of fungal origin.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet un gène chimère contenant une séquence d'ADN codant pour la drosomicine, un vecteur contenant le gène chimère, un procédé pour la transformation des plantes et les plantes transformées. La drosomicine produite par les plantes transformées leur confère une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun			PT	Portugal		
CN	Chine	KR	République de Corée	RO	Roumanie		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SE	Suède		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapour		
EE	Estonie	LR	Libéria				

GENE CHIMERE CODANT POUR LA DROSOMICINE, VECTEUR LE CONTENANT ET OBTENTION DES PLANTES TRANSGENIQUES RESISTANTES AUX MALADIES

5 La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour la drosomicine, un gène chimère la contenant, un vecteur contenant le gène chimère et un procédé pour la transformation des plantes et les plantes transformées résistantes aux maladies.

Il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes 10 contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

15 On connaît différentes substances d'origine naturelle, en particulier des peptides, présentant des propriétés bactéricides ou fongicides, notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes. Toutefois, le problème consiste à trouver de telles substances qui pourront non seulement être produites par des plantes transformées, mais encore conserver leurs propriétés bactéricides ou fongicides et les 20 conférer aux dites plantes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

Les drosomicines sont des peptides produits par les larves et adultes de drosophiles par induction à la suite d'une blessure septique ou de l'injection d'une 25 faible dose de bactéries. Un peptide a déjà été décrit comme présentant certaines propriétés antifongiques et antibactériennes in vitro, notamment dans la demande de brevet français 2 725 992, où le peptide est obtenu par induction sur les drosophiles et purification. Le gène codant pour ce même peptide a également été décrit par Fehlbaum & coll. (1994). La possibilité d'intégrer ce gène à une plante pour lui 30 conférer une résistance aux maladies d'origine fongique ou bactérienne n'a toutefois pas été décrite à ce jour.

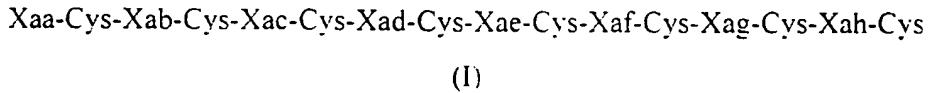
On a maintenant trouvé que les gènes des drosomicines pouvaient être insérés dans les plantes pour leur conférer des propriétés de résistance aux maladies fongiques

et aux maladies d'origine bactérienne, apportant une solution particulièrement avantageuse au problème énoncé ci-dessus.

L'invention a donc d'abord pour objet un gène chimère comprenant un fragment d'acide nucléique codant pour une drosomicine ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans les plantes et un vecteur pour la transformation des plantes contenant ce gène chimère. Elle comprend aussi une cellule végétale transformée contenant au moins un fragment d'acide nucléique codant pour la drosomicine et une plante résistante aux maladies contenant la dite cellule. Elle concerne enfin un procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies dans lequel on insère un gène codant pour la drosomicine.

Par drosomicine, on entend selon l'invention tout peptide pouvant être isolé des larves et adultes de drosophiles par induction à la suite d'une blessure septique ou de l'injection d'une faible dose de bactéries, ces peptides comprenant au moins 44 acides 15 aminés et 8 résidus cystéine formant entre eux des ponts disulfure.

De manière avantageuse, la drosomicine comprend essentiellement la séquence peptidique de formule (I) ci-dessous :



20 dans laquelle

Xaa représente un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé.

Xab représente un reste peptidique de 8 acides aminés.

Xac représente un reste peptidique de 7 acides aminés.

Xad représente un reste peptidique de 3 acides aminés.

25 Xae représente un reste peptidique de 9 acides aminés.

Xaf représente un reste peptidique de 5 acides aminés.

Xag représente un reste peptidique d'un acide aminé, et

Xah représente un reste peptidique de 2 acides aminés.

De manière avantageuse, Xab et/ou Xad et/ou Xac comprennent au moins un 30 acide aminé basique. Plus avantageusement, Xab comprend au moins 2 acides aminés basiques, de préférence 2 et/ou Xad et/ou Xaf comprennent au moins 1 acide aminé basique, de préférence 1. Par acide aminé basique, on entend selon l'invention les acides aminés choisis parmi la lysine, l'arginine ou l'homoarginine.

De manière préférentielle.

Xaa représente la séquence peptidique Xaa'-Asp- dans laquelle Xaa' représente NH₂ ou un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé, et/ou

Xab représente la séquence peptidique -Leu-Xab'-Pro- dans laquelle Xab' représente un reste peptidique de 6 acides aminés, et/ou

Xac représente la séquence peptidique -Ala-Xac'-Thr- dans laquelle Xac' représente un reste peptidique de 5 acides aminés, et/ou

Xad représente la séquence peptidique -Arg-Xad'-Val, dans laquelle Xad' représente un reste peptidique d'un acide aminé, et/ou

10 Xae représente la séquence peptidique -Lys-Xae'-His- dans laquelle Xae' représente un reste peptidique de 7 acides aminés, et/ou

Xaf représente la séquence peptidique -Ser-Xaf'-Lys- dans laquelle Xaf' représente un reste peptidique de 3 acides aminés, et/ou

Xag représente Trp, et/ou

15 Xah représente le reste peptidique Glu-Gly.

De manière plus préférentielle,

Xab' représente la séquence peptidique Ser-Gly-Arg-Tyr-Lys-Gly, et/ou

Xac' représente la séquence peptidique Val-Trp-Asp-Asn-Glu, et/ou

Xad' représente Arg, et/ou

20 Xae' représente la séquence peptidique Glu-Glu-Gly-Arg-Ser-Ser-Gly, et/ou

Xaf' représente la séquence peptidique Pro-Ser-Leu.

Selon un mode plus préférentiel de réalisation de l'invention, la drosomicine est la séquence peptidique représentée par l'identificateur de séquence n° 4 (SEQ ID No 4) et les séquences peptidiques homologues.

25 Par séquence peptidiques homologues, on entend toute séquence équivalente comprenant au moins 65 % d'homologie avec la séquence représentée par l'identificateur de séquence n° 4, étant entendu que les 8 résidus cystéine et le nombre d'acides aminés les séparant restent identiques certains acides aminés étant remplacés par des acides aminés différents mais équivalents sur des sites n'induisant pas de

30 modification substantielle de l'activité antifongique ou antibactérienne de la dite séquence homologue. De préférence, les séquences homologues comprennent au moins 75 % d'homologie, plus préférentiellement au moins 85 % d'homologie, encore plus préférentiellement 90 % d'homologie.

Le résidu NH₂ terminal peut présenter une modification post-traductionnelle, par exemple une acétylation, de même que le résidu C-terminal peut présenter une modification post-traductionnelle, par exemple une amidation.

Par séquence peptidique comprenant essentiellement la séquence peptidique de formule générale (I), on entend non seulement les séquences définies ci-dessus, mais également de telles séquences comprenant à l'une ou l'autre de leurs extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques, notamment nécessaires à leur expression et ciblage dans les cellules végétales ou dans les plantes.

Il s'agit notamment de la drosomicine « full length » (longueur totale) représentée 10 par l'identificateur de séquence n°2 (SEQ ID No 2).

Il s'agit en particulier d'un peptide de fusion « peptide-drosomicine » ou « drosomicine-peptide », avantageusement « peptide-drosomicine », dont la coupure par les systèmes enzymatiques des cellules végétales permet la libération de la drosomicine, définie ci-dessus. Le peptide fusionné à la drosomicine peut être un peptide signal ou un 15 peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de la drosomicine de manière spécifique dans une partie de la cellule végétale ou de la plante, comme par exemple le cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de compartiments cellulaires ou de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage 20 chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association avec un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide 25 d'adressage vacuolaire ou « propeptide ». Le réticulum endoplasmique est le lieu où sont pris en charge par la « machinerie cellulaire » des opérations de maturation de la protéine produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

Les peptides de transit peuvent être soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le 30 sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour

une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande EP 0 508 909.

Comme peptide de transit utile selon l'invention, on peut citer en particulier le peptide signal du gène PR-1 α du tabac (WO 95/19443), ou encore l'ubiquitine représentée fusionnée à la drosomicine par l'identificateur de séquence n° 6.

5 Le peptide de fusion « ubiquitine-drosomicine » et sa séquence codante sont également partie de la présente invention, en particulier décrits par l'identificateur de séquence n° 5.

La présente invention concerne donc un gène chimère comprenant une 10 séquence codante pour la drosomicine ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans les plantes, la séquence codante comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour la drosomicine telle que 15 définie ci-dessus.

La séquence d'ADN peut être obtenue selon les méthodes standards d'isolation et de purification à partir des drosophiles, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles 15 d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont notamment décrites par Ausubel *et al.*

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence d'ADN codant pour la drosomicine comprend la séquence d'ADN décrite par les bases 21 à 152 de 20 l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3), une séquence homologue ou complémentaire de ladite séquence.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence d'ADN codant pour la drosomicine « full length » comprend la séquence d'ADN décrite par les bases 101 à 310 de l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID No 1), une séquence homologue ou complémentaire de ladite séquence.

25 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence d'ADN codant pour le peptide de fusion « peptide-héliomicine » comprend la séquence d'ADN décrite par les bases 15 à 221 de l'identificateur de séquence n°5 (SEQ ID NO 5), une séquence homologue ou une séquence complémentaire des dites séquences.

Par « homologue », on entend selon l'invention toute séquence d'ADN présentant 30 une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence nucléotidique décrite par les identificateurs de séquences n° 1, 3 ou 5 et codant pour la drosomicine, la drosomicine « full length » ou le peptide de fusion « peptide-drosomicine ». Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore

en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence décrite par les identificateurs de séquences n° 1, 3 ou 5 et l'homologue correspondant peuvent être importantes, d'autant plus qu'il s'agit de fragments d'ADN de faible taille réalisables par synthèse chimique. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement neutres, c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de la drosomicine ou du peptide de fusion résultants.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals. des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes. des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention. tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones. plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine. comme le maïs. le blé. le colza. le soja, le riz. la canne à sucre. la betterave. le tabac. le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression de la séquence d'ADN codant pour la drosomicine sont bien connus de l'homme du métier en fonction de la plante. Ils comprennent notamment des séquences promotrices. des activateurs de transcription, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes. on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne. virale ou végétale tel que, par exemple. celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) ou d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), ou un promoteur inductible par les pathogènes comme le PR-la du tabac, tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante de manière constitutive ou induite par l'attaque d'un pathogène. tel que par exemple. celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la

demande EP 0 507 698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un 10 terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

La présente invention concerne également un vecteur d'intégration pour la transformation des plantes contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des cellules 15 végétales par intégration d'au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les demandes citées dans la présente demande.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules ou des protoplastes 20 avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN.

Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou 25 l'électroporation.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de la plante, notamment de son caractère monocotylédone ou dicotylédone.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, 30 US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486

234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales, de plantes monocotylédones ou dicotylédones, notamment de cultures, transformées et contenant dans leur génome une quantité efficace d'un gène comprenant une séquence codante pour la drosomicine définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépende de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les brevets et demandes ci-dessus.

10 La présente invention a également pour objet les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines des plantes transformées.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à certaines maladies fongiques. De ce fait, la séquence d'ADN codant pour 15 la drosomicine peut être intégré avec pour objectif principal la réalisation de plantes résistantes aux dites maladies, la drosomicine étant efficace contre des maladies fongiques telles que celles causées par *Botrytis*, en particulier *Botrytis cinerea* (mycélium ou spores), *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Septoria*, en particulier *Septoria tritici*, ou *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* (mycélium 20 ou spores) ou *Fusarium graminearum*.

Le gène chimère pourra comprendre également et de manière avantageuse au moins un marqueur de sélection, tel qu'un ou plusieurs gènes de tolérance aux herbicides.

La séquence d'ADN codant pour la drosomicine peut également être intégrée comme marqueur de sélection lors de la transformation de plantes avec d'autres séquences 25 codant pour d'autres peptides ou protéines d'intérêt, comme par exemple des gènes de tolérance aux herbicides.

De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

30 Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre outre la séquence codant pour la drosomicine, d'autres séquences hétérologues codant pour des protéines d'intérêt comme d'autres peptides complémentaires susceptibles de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou

fongique, et/ou d'autres séquences codant pour des protéines de tolérance aux herbicides et/ou d'autres séquences codant pour des protéines de résistance aux insectes, comme les protéines *Bt* notamment.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur comprenant un gène chimère, lequel comprend une première séquence codant pour la drosomicine et au moins une autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

10 Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour la drosomicine, l'autre portant un gène codant pour au moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

La présente invention concerne enfin un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention, le procédé consistant à planter les graines des dites plantes 15 transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une composition agrochimique, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

20 Par composition agrochimique, on entend selon l'invention toute composition agrochimique comprenant au moins un produit actif ayant l'une des activités suivantes, herbicide, fongicide, bactéricide, virucide ou insecticide.

Selon un mode préférentiel de réalisation du procédé de culture selon l'invention, la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une 25 activité fongicide et/ou bactéricide, plus préférentiellement présentant une activité complémentaire de celle de la drosomicine produite par les plantes transformées selon l'invention.

Par produit présentant une activité complémentaire de celle de la drosomicine, on entend selon l'invention un produit présentant un spectre d'activité complémentaire, c'est 30 à dire un produit qui sera actif contre des attaques de contaminants (champignons, bactéries ou virus) insensibles à la drosomicine, ou encore un produit dont le spectre d'activité recouvre celui de la drosomicine, totalement ou en partie, et dont la dose d'application sera diminuée de manière substantielle du fait de la présence de la

drosomicine produite par la plante transformée.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, la préparation du gène chimère, du vecteur d'intégration, des plantes transformées et leur résistance à différentes maladies d'origine fongique. Les figures 1 à 7 en annexe décrivent les structures schématiques de certains plasmides préparés pour la construction des gènes chimères. Dans ces figures, les différents sites de restriction sont marqués en *italiques*.

Exemple 1: Construction des gènes chimères

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standard de laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques sont notamment décrits dans Ausubel & coll.

pRPA-RD-180:

On insère un clone entier de l'ADNc codant pour la drosomicine décrit par Fehlbaum & coll (SEQ. ID N° 1) dans le plasmide pCR-1000 (INVITROGEN) comme fragment *EcoRI-HindIII*.

pRPA-RD-182: Création d'une région codant pour la drosomicine dite "longueur totale" (correspondant au peptide pre-pro) en éliminant la région non transcrise en 5' et en supprimant le premier codon ATG.

Le plasmide pRPA-RD-180 est digéré avec les enzymes de restriction *Scal*I et *EcoRI*. et le grand fragment d'ADN est purifié. Un oligonucléotide synthétique double brins de séquence Oligo 1 suivante est ensuite lié à la séquence d'ADN purifiée dérivée de pRPA-RD-180:

Oligo 1: 5' AATTCCCGAAGACGACATGCAGATCAAGT 3'
 25 GGGCTTCTGCTGTACGTCTAGTTCA

pRPA-RD-183: Création d'une séquence codant pour la drosomicine mature qui ne comprend pas la région non transcrrite en 3'.

30 Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires de séquences Oligo 2 et Oligo 3 ci-après sont hybridés à 65°C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30'.

Oligo 2: 5' GAGAGATCCC CCGCGGTGGT GACTGCCTGT CCGGAAGATA
CAAGGGTCCC TGTGCCGTCT GGGACAAACGA GACCTGTCGT
CGTGTGTGCA AGGAGGGAGGG 3'

5 Oligo 3: 5' GCGCGCGGAT CCTTAGCATC CTTCGCACCA GCACTTCAGA
CTGGGGCTGC AGTGGCCACT GGAGCGTCCC TCCTCCTTGC
ACACACGACG 3'

Après hybridation entre l'Oligo 2 et l'Oligo 3, l'ADN resté simple brin sert de 10 matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabricant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin. Cet oligonucléotide double brin est ensuite digéré par les enzymes de restriction *SacII* et *EcoRI* et clonés dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les mêmes enzymes de restriction. On obtient alors un clone 15 comprenant la région codante pour la drosomicine mature située entre les sites de restriction *SacII* et *BamHI* (SEQ ID 3).

pRPA-RD-186: Elimination de la région 3' non transcrrite de la région codante pour la drosomicine longueur totale de pRPA-RD-182.

Le plasmide pRPA-RD-182 est digéré avec les enzymes de restriction *BspEI* et 20 *KpnI*. Le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-RD-183 est ensuite digéré avec les enzymes de restriction *BspEI* et *KpnI*, et le petit fragment d'ADN est purifié. Ces deux fragments purifiés sont ensuite liés de manière à obtenir un 25 plasmide contenant la région codante pour le peptide pre-pro de la drosomicine dont le premier codon ATG et les deux régions non codantes en 5' et 3' ont été supprimées (SEQ ID 5).

pRPA-RD-187: Crédation d'un vecteur d'expression dans les plantes comprenant la séquence codante pour la forme mature de la drosomicine.

Le plasmide pUGUS(118), dérivé du pUC-19, a été obtenu auprès du Dr. Richard Vierstra de l'Université du Wisconsin (plasmide non décrit). Ce plasmide dont 30 la structure schématique est représentée sur la figure 1, contient le promoteur CaMV 35S qui dirige l'expression d'un ARN contenant la séquence non traduite en 5' du virus de la mosaïque alfalfa (AMV 5' UTR; Brederode & coll., 1980), la région N-terminale du gène de l'ubiquitine ubq11 d'*Arabidopsis thaliana* jusqu'au site de clivage de l'ubiquitine hydrolase (ubq11 N-term; Callis & coll., 1993) laquelle est fusionnée dans

le même cadre de lecture avec le gène de la β -glucuronidase de *E. coli* (GUS: Jefferson & coll., 1987), suivi du site de polyadenylation du gène de la nopaline synthase d'*A. tumefaciens* (NOS polyA; Bevan & coll., 1983).

Le plasmide pUGUS(118) est digéré avec les enzymes de restriction *SacII* et 5 *BamHI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-RD-183 est digéré avec les enzymes de restriction *SacII* et *BamHI* et le petit fragment d'ADN contenant la région codante pour la forme mature de la drosomicine est ensuite purifié. Les deux 10 fragments d'ADN purifiés sont liés ensemble dans une cassette d'expression dans les plantes qui synthétisent une protéine de fusion ubiquitine-drosomicine dans le cytoplasme des cellules végétales. La structure schématique de cette cassette d'expression est représentée sur la figure 2. Sous l'action de l'ubiquitine hydrolase sur cette protéine de fusion, la drosomicine mature est libérée dans le cytoplasme des cellules de la plante.

pRPA-RD-188: Création d'un vecteur d'expression dans les plantes comprenant 15 la longueur totale de la séquence codant pour la drosomicine (pre-pro).

Le plasmide pRTL-2 GUS, dérivé du plasmide pUC-19, a été obtenu auprès du Dr. Jim Carrington (Texas A&M University, non décrit). Ce plasmide dont la structure schématique est représentée sur la figure 3, contient le promoteur CaMV 35S dupliqué isolé du virus de la mosaïque du choux fleur (Promoteur CaMV 2x35S; Odell & coll.. 20 1985) qui dirige l'expression d'un ARN contenant séquence non traduite en 5' du virus etch du tabac (TEV 5' UTR: Carrington & Freed, 1990), le gène de la β -glucuronidase de *E. coli* (GUS Jefferson & coll.. 1987) suivi du site de polyadenylation de l'ARN 35S de CaMV (CaMV polyA: Odell & coll.. 1985).

Le plasmide pRTL-2 GUS est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et 25 *BamHI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-RD-186 est digéré avec les enzymes de restriction *BbsII* et *BamHI* et le petit fragment d'ADN contenant la région codant pour la drosomicine pre-pro est purifié. Les deux fragments d'ADN purifiés sont ensuite liés ensemble dans une cassette d'expression dans les plantes qui synthétisent une protéine de drosomicine pre-pro. La structure schématique de cette 30 cassette d'expression est représentée sur la figure 4. « pre-pro-drosomicine » représente la région codante pour la drosomicine de pRPA-RD-186. La drosomicine est transportée vers la matrice extra-cellulaire de la plante par l'action d'un peptide signal (pre-pro).

pRPA-RD-195: Création d'un plasmide contenant un site de clonage multiple modifié.

Le plasmide pRPA-RD-195 est un plasmide dérivé du pUC-19 qui contient un site de clonage multiple modifié. Les oligonucléotides synthétiques complémentaires

5 Oligo 4 et Oligo 5 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-RD-183.

Oligo 4: 5' AGGGCCCCCT AGGGTTAAA CGGCCAGTCA GGCGGAATTC
10 GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG
CATGC 3'

Oligo 5: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT
 GCATGCCTGC AGGTGCACTC TAGAGG 3'

15 L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite lié dans pUC-19 qui a été préalablement digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* et rendu bouts francs en employant le fragment klenow de l'ADN polymérase 1 de *E. coli*. On obtient un vecteur contenant de multiples sites de clonage pour faciliter l'introduction des cassettes d'expression dans un plasmide vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*. La 20 structure schématique de ce site de clonage multiple est représentée sur la figure 5.

pRPA-RD-190: Introduction de la cassette d'expression de la drosomicine de pRPA-RD-187 dans pRPA-RD-195.

Le plasmide pRPA-RD-187 est digéré avec les enzymes de restriction *KpnI* et *Sall*, et le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de la drosomicine est purifié. Le fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RD-195 qui a été préalablement digéré avec les même enzymes de restriction.

pRPA-RD-191: Introduction de la cassette d'expression de la drosomicine de pRPA-RD-188 dans pRPA-RD-195.

Le plasmide pRPA-RD-188 est digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII* et déphosphorylé avec de la phosphatase intestinale de veau. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de la drosomicine est purifié. Le fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RP-195 qui a été préalablement digéré avec l'enzyme de

restriction *HindIII*.

pRPA-RD-174: Plasmide dérivé de pRPA-BL-150A (EP 0 508 909) contenant le gène de tolérance au bromoxynil de pRPA-BL-237 (EP 0 508 909).

Le gène de tolérance au bromoxynil est isolé de pRPA-BL-237 par une amplification génique par PCR. Le fragment obtenu est à bouts francs et est cloné dans le site *EcoRI* de pRPA-BL-150A qui a été rendu bouts francs par l'action de la polymérase klenow dans des conditions standard. On obtient un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* qui contient le gène de tolérance au bromoxynil à proximité de sa bordure droite, un gène de tolérance à la kanamycine à proximité de sa bordure gauche et le site de clonage multiple de pUC-19 entre ces deux gènes.

La structure schématique de pRPA-RD-174 est représentée sur la figure 6. Sur cette figure, "nos" représente le site de polyadenylation de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NOS pro" représente le promoteur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NPT II" représente le gène de la néomycine phosphotransphérase du transposon Tn5 de *E. coli* (Rothstein & coll., 1981), "35S pro" représente le promoteur 35S isolé du virus de la mosaïque du choux fleur (Odell & coll., 1985), "BRX" représente le gène de la nitrilase isolé de *K. ozaenae* (Stalker & coll., 1988), "RB" et "LB" représentent respectivement les bordures droite et gauche de la séquence d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

pRPA-RD-184: Addition d'un nouveau site de restriction, unique, dans pRPA-RD-174.

Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 6 et Oligo 7 ci-après sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-RD-183.

Oligo 6: 5' CGGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC
 CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG
 TACCTGGTTC AGG 3'
Oligo 7: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA
 CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTAAC TTAATTAAGT
 GTGGCCTGAC TGG 3'

L'oligonucléotide double brin hybride (95 paires de bases) est purifié après séparation sur un gel d'agarose (3 % Nusieve, FMC). Le plasmide pRPA-RD-174 est digéré avec l'enzyme de restriction *XbaI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Les

deux fragments d'ADN obtenus sont ensuite liés.

On obtient un plasmide dérivé de pRPA-RD-174 comprenant d'autres sites de restriction entre le gène de tolérance au bromoxynil et le gène de la kanamycine marqueur de sélection.

La structure schématique du plasmide pRPA-RD-184 est représentée sur la figure 7 où les termes "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" et "LB" ont la même signification que pour la figure 6.

pRPA-RD-192: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour la drosomicine dirigée vers le cytosol des cellules.

Le plasmide pRPA-RD-190 est digéré avec les enzymes de restriction *Apal* et *Ascl*, et le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de la drosomicine est purifié. Le fragment d'ADN purifié contenant la cassette d'expression de la drosomicine est lié dans pRPA-RD-184, après digestion préalable avec les même deux enzymes. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence codant pour la protéine de fusion drosomicine-ubiquitine qui conduit à l'expression de la drosomicine dans le cytosol des cellules de la plante.

pRPA-RD-193: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour la drosomicine dirigée vers la matrice extracellulaire.

On reprend le mode opératoire décrit ci-dessus avec le plasmide pRPA-RD-191 et les enzymes de restriction *PmeI* et *Ascl*, remplaçant le plasmide pRPA-RD-190 et les enzymes de restriction *Apal* et *Ascl*. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence codant pour la protéine pre-pro de la drosomicine qui conduit à l'expression de la drosomicine dans la matrice extracellulaire de la plante.

Exemple 2: Tolérance aux herbicides des tabacs transformés.

2.1- Transformation

Les vecteurs pRPA-RD-192 and pRPA-RD-193 sont introduit dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood & coll., 1987) porteuse du cosmid pTVK291 (Komari & coll., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh & coll. (1985).

2.2- Régénération

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et transformées selon la technique des disques foliaires (Horsh & coll., 1985) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30 g/l de saccharose contenant 0.05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

2.3- Tolérance au bromoxynil

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour chaque construction pRPA-RD-192 et pRPA-RD-193. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension aqueuse de Pardner correspondant à 0,2 kg de matière active bromoxynil par hectare.

Toutes les plantes montrant une tolérance complète au bromoxynil sont employées dans les expérimentations suivantes pour tester les effets de l'expression de la drosomicine sur la tolérance des plantes transformées aux agressions fongiques.

Exemple 3: Détection de la drosomicine dans les tabacs transformés

Une analyse immunoblot (telle que décrites par Coligan & coll.) est employée pour détecter la drosomicine produite par les tabacs transformés, en employant un anticorps de lapin dirigé contre la drosomicine synthétique fixée sur une protéine porteuse KLH, avec la drosomicine synthétique comme antigène.

Les protéines de feuilles sont extraites d'abord par broyage des tissus congelés à -180°C, suivi par l'addition d'un tampon d'extraction (urée 8 M, tris HCl pH 6.8 50 mM, SDS 2 %, β-mercaptopropanol 5 %, saccharose 10 %, EDTA 2 mM et dithiothreitol 10 mM). La quantité totale de protéines extractables est ensuite mesurée. 100 µg de protéines extraites sont ensuite chargées dans des puits de gel SDS-PAGE

(20 % acrylamide) pour une analyse immunoblot (selon Coligan & coll.).

Pour les plantes transformées avec le plasmide pRPA-RD-193 (drosomicine pre-pro), on a trouvé jusqu'à 160 ng de drosomicine pour 100 µg du total de protéines extraites des feuilles.

5 Pour les plantes transformées avec le plasmide pRPA-RD-192 (drosomicine mature), on a trouvé jusqu'à 50 ng de drosomicine pour 100 µg du total de protéines extraites des feuilles.

La drosomicine synthétisée et isolée dans les plantes transformées avec les 10 plasmides pRPA-RD-192 et pRPA-RD-193 co-migre avec la drosomicine isolée des drosophiles. Ce résultat montrent que chacune des drosomicines dirigée soit vers le cytoplasme (pRPA-RD-192) soit vers la matrice extracellulaire (pRPA-RD-193) conduisent à une drosomicine mature. En outre, le système de gel employé dans cet 15 analyse (20 % acrylamide) aurait permis de détecter aisément de la drosomicine qui n'aurait pas été transformée puisque les deux constructions (ubiquitine-drosomicine et drosomicine pre-pro) font approximativement 10 kD, contre 5 kD pour la drosomicine mature.

Exemple 4: Résistance au *Botrytis cinerea* des tabacs transformés.

15/20 plantes issues des plantes obtenues à l'exemple 2.3. sont cultivées en 20 serre dans des pots de repiquage de 7 cm de côté dans les conditions suivantes:

- température: 16° C durant la nuit; 19° C durant le jour;
- photopériode: 14 h de nuit; 10 h de jour,
- hygrométrie: 90-1400

Deux feuilles par plantes sont inoculées avec 6 disques de 6 mm de diamètre 25 par feuille, chaque disque étant constitué d'une suspension de *Botrytis cinerea* (100 000 spores/ml). L'évolution de l'infection est observée 7 jours après l'innoculation en mesurant l'augmentation du diamètre de chaque disque.

Pour l'essentiel des plantes transformées par le plasmide pRPA-RD-192 (protéine mature dans le cytoplasme) ou par le plasmide pRPA-RD-193 (drosomicine 30 extra-cellulaire), on observe une absence d'augmentation des diamètres des disques, ou une augmentation très minime, ce qui indique une forte résistance aux infections causées par *Botritis cinerea*.

Exemple 5: Résistance à *Chalara elegans* des tabacs transformés.

On reprend le mode opératoire précédent avec les conditions opératoires suivantes:

- 5 - température: 18° C durant la nuit; 22° C durant le jour;
- photopériode: 14 h de nuit; 10 h de jour.

L'innoculation est effectuée 18 jours après le semis par apport dans chaque pot de 1 ml d'une suspension d'endoconidies à 1 000 000 conidies/ml. La lecture des résultats de l'infection est effectuée 21 jours après l'innoculation en observant les racines des plantules préalablement nettoyées à l'eau. L'évolution de la maladie est
10 appréciée par une échelle de notation de 0 à 11, 0 correspondant à une absence d'infection. Pour les plantes transformées par le plasmide pRPA-RD-192 (protéine mature dans le cytoplasme) et celles transformées par le plasmide pRPA-RD-193 (drosomicine extra-cellulaire), la notation moyenne est de 4, ce qui correspond à une forte résistance à *Chalara elegans*.

15

Les résultats obtenus *in vivo* dans les exemples 4 et 5 montrent que la transformation par le gène chimère selon l'invention confère à la plante transformée de nouvelles propriétés de résistance aux champignons. Activité est liée à la conservation des propriétés antifongiques de la drosomicine produite par les plantes transformées
20 selon l'invention.

REFERENCES

- Ausubel, F. A. & coll. (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology. Publ.
25 Wiley & Sons.
- Bevan, M. & coll. (1983). Nuc. Acids Res. 11:369-385.
- Brederode, F.T.M. & coll. (1980). Nuc. Acids Res. 8:2213-2223.
- Callis & coll. (1993). Plant Mol. Biol. 21:895-906.
- Carrington and Freed (1990). J. Virol. 64:1590-1597.
- 30 Coligan, J.E. & coll. (ed. V.B. Chanda). Current Protocols in Protein Science. Publ.
Wiley & Sons.
- Fehlbaum & coll. (1994). J. Biol. Chem 269: 331459-33163.
- Horsch & coll. (1985). Science 227:1229-1231.

- Jefferson & coll. (1987). EMBO J. 6:3901-3907.
- Komari & coll. (1986). J. Bacteriol. 166:88-94.
- Rothstein & coll. (1981). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 45: 99-105.
- Stalker & coll. (1988). J. Biol. Chem. 263:6310-6314.
- 5 Odell, J.T. & coll. (1985). Nature 313:810-812.

REVENDICATIONS

1. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans une plante.
 5 caractérisé en ce que la séquence codante comprend au moins une séquence d'ADN codant pour la drosomicine.

2. Gène chimère selon la revendication 1, caractérisée en ce que la drosomicine comprend essentiellement la séquence peptidique de formule (I) ci-dessous :

10 Xaa-Cys-Xab-Cys-Xac-Cys-Xad-Cys-Xae-Cys-Xaf-Cys-Xag-Cys-Xah-Cys
 (I)

dans laquelle

Xaa représente un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé,

Xab représente un reste peptidique de 8 acides aminés,

15 Xac représente un reste peptidique de 7 acides aminés,

Xad représente un reste peptidique de 3 acides aminés.

Xae représente un reste peptidique de 9 acides aminés,

Xaf représente un reste peptidique de 5 acides aminés,

Xag représente un reste peptidique d'un acide aminé, et

20 Xah représente un reste peptidique de 2 acides aminés.

3. Gène chimère selon la revendication 2, caractérisé en ce que Xab et/ou Xad et/ou Xac comprennent au moins un acide aminé basique.

4. Gène chimère selon la revdication 3, caractérisé en ce que Xab comprend au moins 2 acides aminés basiques, de préférence 2 et/ou Xad et/ou Xaf comprennent au moins 1 acide aminé basique, de préférence 1.

5. Gène chimère selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que

Xaa représente la séquence peptidique Xaa'-Asp- dans laquelle Xaa' représente NH₂ ou un reste peptidique comprenant au moins 1 acide aminé, et/ou

30 Xab représente la séquence peptidique -Leu-Xab'-Pro- dans laquelle Xab' représente un reste peptidique de 6 acides aminés, et/ou

Xac représente la séquence peptidique -Ala-Xac'-Thr- dans laquelle Xac' représente un reste peptidique de 5 acides aminés, et/ou

Xad représente la séquence peptidique -Arg-Xad'-Val, dans laquelle Xad' représente un reste peptidique d'un acide aminé, et/ou

Xae représente la séquence peptidique -Lys-Xae'-His- dans laquelle Xae' représente un reste peptidique de 7 acides aminés, et/ou

5 Xaf représente la séquence peptidique -Ser-Xaf-Lys- dans laquelle Xaf représente un reste peptidique de 3 acides aminés, et/ou

Xag représente Trp, et/ou

Xah représente le reste peptidique Glu-Gly.

6. Gène chimère selon la revendication 5, caractérisé en ce que

10 Xab' représente la séquence peptidique Ser-Gly-Arg-Tyr-Lys-Gly, et/ou

Xac' représente la séquence peptidique Val-Trp-Asp-Asn-Glu, et/ou

Xad' représente Arg, et/ou

Xae' représente la séquence peptidique Glu-Glu-Gly-Arg-Ser-Ser-Gly, et/ou

Xaf' représente la séquence peptidique Pro-Ser-Leu.

15 7. Gène chimère selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que

la drosomicine est la séquence peptidique représentée par l'identificateur de séquence

n° 4 (SEQ ID No 4) et les séquences peptidiques homologues.

8. Gène chimère selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la drosomicine est un peptide de fusion « peptide-drosomicine », dont la coupure par les

20 systèmes enzymatiques des cellules végétales permet la libération de la drosomicine, définie dans les revendications 1 à 7.

9. Gène chimère selon la revendication 8, caractérisé en ce que le peptide de fusion « peptide-drosomicine » est représenté par l'identificateur de séquence n° 6 (SEQ ID No 6).

25 10. Peptide de fusion « peptide-drosomicine », caractérisé en ce que la drosomicine est définie selon les revendications 1 à 7.

11. Peptide de fusion selon la revendication 10, caractérisé en ce que le peptide est être un peptide signal ou un peptide de transit.

12. Peptide de fusion selon la revendication 11, caractérisé en ce que le peptide 30 signal est choisi parmi le peptide signal du gène PR-1 α du tabac, ou l'ubiquitine.

13. Gène chimère selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un gène de tolérance aux herbicides.

14. Gène chimère selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce

qu'il comprend en outre au moins une séquence codante pour un autre peptide susceptible de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou fongique.

15. Gène chimère selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les éléments de régulations comprennent les séquences promotrices, les activateurs de transcription, les peptides de transit et/ou les séquences terminatrices.

16. Gène chimère selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la séquence de régulation promotrice est choisie parmi les séquences promotrices d'origine bactérienne, virale ou végétale.

10 17. Gène chimère selon la revendication 16, caractérisé en ce que la séquence de régulation promotrice est choisie parmi le promoteur du gène de la petite sous-unité de ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) ou celui de la mosaïque du choux fieur (CAMV 19S ou 35S).

15 18. Gène chimère selon la revendication 16, caractérisé en ce que la séquence de régulation promotrice comprend au moins un promoteur choisi parmi les promoteurs d'histone ou d'actine.

19. Vecteur pour la transformation des plantes caractérisé en ce qu'il contient au moins un gène chimère selon l'une des revendications 1 à 18.

20. Cellule végétale transformée contenant au moins un ADN tel que défini dans l'une des revendications 1 à 18.

21. Plante résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle comprend une cellule transformée selon la revendication 20.

22. Plante selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par régénération à partir d'une cellule transformée selon la revendication 20.

25 23. Plante transformée résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle est issue de la culture et/ou du croisement des plantes selon l'une des revendications 21 ou 22.

24. Graines de plantes transformées selon l'une des revendications 21 à 23.

25 25. Procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies, caractérisé en ce qu'on insère un gène chimère selon l'une des revendications 1 à 18.

30 26. Procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies fongiques, caractérisé en ce qu'on insère un gène chimère selon l'une des revendications 1 à 18.

27. Procédé selon l'une des revendications 25 ou 26, caractérisé en ce que le transfert est effectué avec *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*.

28. Procédé selon l'une des revendications 25 ou 26, caractérisé en ce que le transfert est effectué par apport par bombardement à l'aide de particules chargées de l'ADN.

29. Procédé selon l'une des revendications 25 à 28, caractérisé en ce que l'on insère également au moins un gène de tolérance aux herbicides.

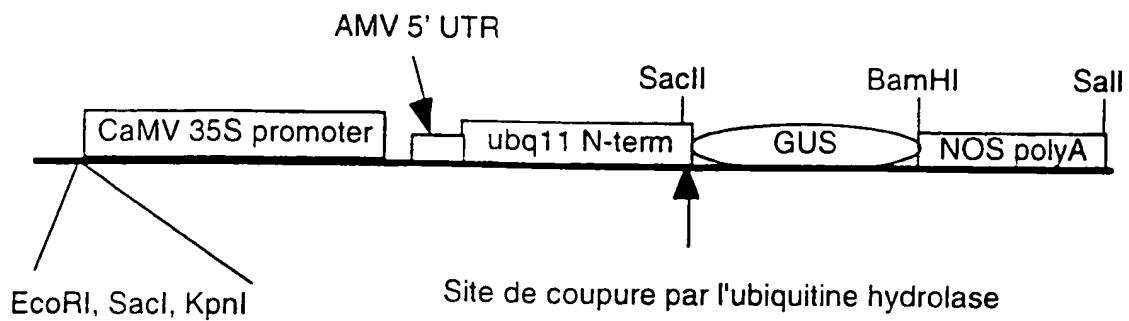
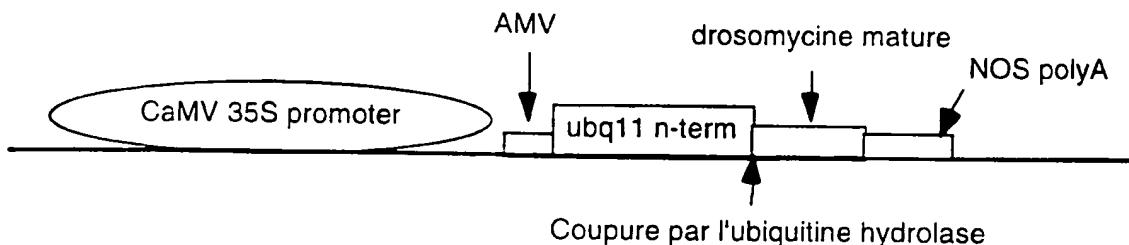
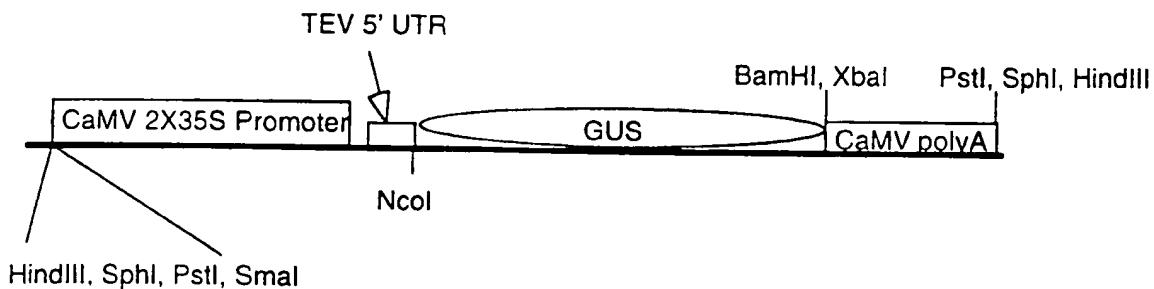
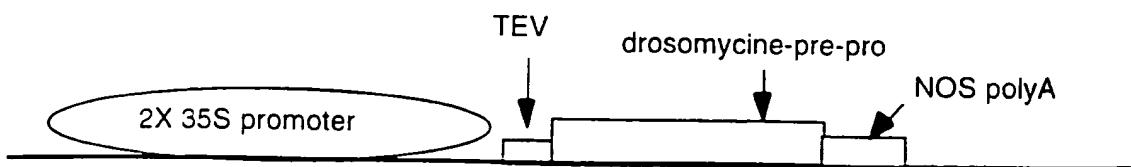
30. Procédé selon l'une des revendications 25 à 29, caractérisé en ce que l'on insère également au moins une séquence codante pour un autre peptide susceptible de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou fongique.

31. Procédé de culture des plantes transformées selon l'une des revendications 21 à 24, caractérisé en ce qu'il consiste à planter les graines des dites plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une composition agrochimique, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

32. Procédé de culture selon la revendication 31, caractérisé en ce que la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une activité fongicide et/ou bactéricide.

33. Procédé de culture selon la revendication 24, caractérisé en ce que le produit actif présente une activité complémentaire de celle de la drosomicine.

1/2

**Fig. 1****Fig. 2****Fig. 3****Fig. 4**

2/2

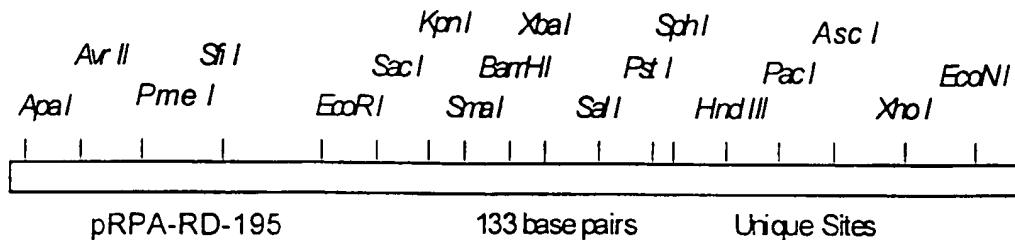


Fig. 5

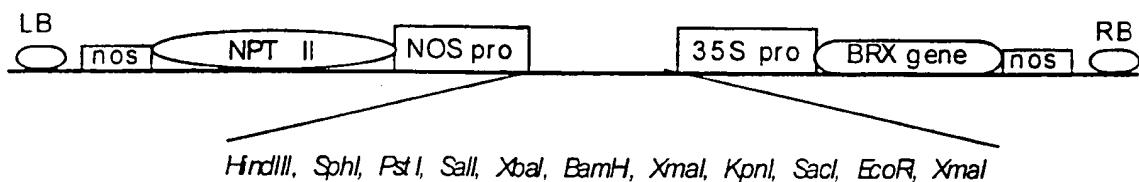


Fig. 6

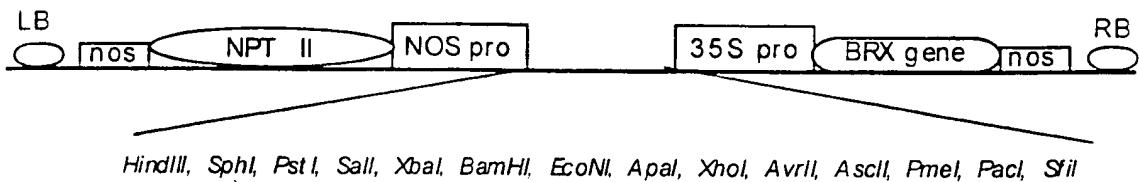


Fig. 7

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC AGROCHIMIE
- (B) RUE: 14/20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: Lyon
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Gène chimère codant pour la drosomicine, vecteur le contenant pour la transformation des cellules végétales et plantes transformées obtenues résistantes aux maladies

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 14

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 488 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) SOURCE D'ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Drosophila melanogaster

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (B) CLONE: pRPA-RD-180

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 101..310

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:1:

GAATTCGAGC TCGGTACCCC TCGAGACCAT GGTGACCCCC ACGCGTCCGG ATAATTCTTT	60	
CAGAAATCAT TTACCAAGCT CCGTGAGAAC CTTTTCCAAT ATG ATG CAG ATC AAG	115	
Met Met Gln Ile Lys		
;	5	
TAC TTG TTC GCC CTC TTC GCT GTC CTG ATG CTG GTG GTG CTG GGA GCC	163	
Tyr Leu Phe Ala Leu Phe Ala Val Leu Met Leu Val Val Leu Gly Ala		
10	15	20
AAC GAG GCC GAT GCC GAC TGC CTG TCC GGA AGA TAC AAG GGT CCC TGT	211	

Asn Glu Ala Asp Ala Asp Cys Leu Ser Gly Arg Tyr Lys Gly Pro Cys		
25	30	35
GCC GTC TGG GAC AAC GAG ACC TGT CGT GTG TGC AAG GAG GAG GGA		259
Ala Val Trp Asp Asn Glu Thr Cys Arg Arg Val Cys Lys Glu Glu Gly		
40	45	50
CGC TCC AGT GGC CAC TGC AGC CCC AGT CTG AAG TGC TGG TGC GAA GGA		307
Arg Ser Ser Gly His Cys Ser Pro Ser Leu Lys Cys Trp Cys Glu Gly		
55	60	65
TGC TAAATCCATG AGCAATTAGC ATGAACGTT TGAAAAGCGC GTTTAGCTCT		360
Cys		
70		
CCACTACTTA CGACATATTC TATGCTGCAA TATTGAAAAT CTAATAAACAA AAACTAATGT		420
ACATTAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAGGG CGGCCGCGAC CTGCAGGCAT		480
GCAAGCTT		488

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:2:

(i) CHARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 70 acides aminés
- (B) TYPE: acides aminés
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:2:

Met Met Gln Ile Lys Tyr Leu Phe Ala Leu Phe Ala Val Leu Met Leu			
1	5	10	15
Val Val Leu Gly Ala Asn Glu Ala Asp Ala Asp Cys Leu Ser Gly Arg			
20	25	30	
Tyr Lys Gly Pro Cys Ala Val Trp Asp Asn Glu Thr Cys Arg Arg Val			
35	40	45	
Cys Lys Glu Glu Gly Arg Ser Ser Gly His Cys Ser Pro Ser Leu Lys			
50	55	60	
Cys Trp Cys Glu Gly Cys			
65	70		

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:3:

(i) CHARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 167 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) SOURCE D'ORIGINE:

(A) ORGANISME: SynThetique

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: pRPA-RD-163

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 21..152

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:3:

GAGAGATCCC CCGCGGTGGT GAC TGC CTG TCC GGA AGA TAC AAG GGT CCC Asp Cys Leu Ser Gly Arg Tyr Lys Gly Prc 1 5 10	50
TGT GCC GTC TGG GAC AAC GAG ACC TGT CGT CGT GTG TGC AAG GAG GAG Cys Ala Val Trp Asp Asn Glu Thr Cys Arg Arg Val Cys Lys Glu Glu 15 20 25	98
GGA CGC TCC AGT GGC CAC TGC AGC CCC AGT CTG AAG TGC TGG TGC GAA Gly Arg Ser Ser Gly His Cys Ser Pro Ser Leu Lys Cys Trp Cys Glu 30 35 40	146
GGA TGC TAAGGATCCG CGCGC Gly Cys	167

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 44 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:4:

Asp Cys Leu Ser Gly Arg Tyr Lys Gly Pro Cys Ala Val Trp Asp Asn 1 5 10 15
Glu Thr Cys Arg Arg Val Cys Lys Glu Glu Gly Arg Ser Ser Gly His 20 25 30
Cys Ser Prc Ser Leu Lys Cys Trp Cys Glu Gly Cys 35 40

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 236 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(vi) SOURCE D'ORIGINE:

(A) ORGANISME: Synthétique

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: pRPA-RD-186

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 15..221

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:5:

GAATTGAAAGA CGCC ATG CAG ATC AAG TAC TTG TTC GCC CTC TTC GCT GTC Met Gln Ile Lys Tyr Leu Phe Ala Leu Phe Ala Val	50
1 5 10	
CTG ATG CTG GTG GTG CTG GGA GCC AAC GAG GCC GAT GCC GAC TGC CTG Leu Met Leu Val Val Leu Gly Ala Asn Glu Ala Asp Ala Asp Cys Leu	98
15 20 25	
TCC GGA AGA TAC AAG GGT CCC TGT GCC GTC TGG GAC AAC GAG ACC TGT Ser Gly Arg Tyr Lys Gly Pro Cys Ala Val Trp Asp Asn Glu Thr Cys	146
30 35 40	
CGT CGT GTG TGC AAG GAG GAG GGA CGC TCC AGT GGC CAC TGC AGC CCC Arg Arg Val Cys Lys Glu Gly Arg Ser Ser Gly His Cys Ser Prc	194
45 50 55 60	
AGT CTG AAG TGC TGG TGC GAA GGA TGC TAAGGATCCG CGCGC Ser Leu Lys Cys Trp Cys Glu Gly Cys	236
65	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 69 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:6:

Met Gln Ile Lys Tyr Leu Phe Ala Leu Phe Ala Val Leu Met Leu Val	
1 5 10 15	
Val Leu Gly Ala Asn Glu Ala Asp Ala Asp Cys Leu Ser Gly Arg Tyr	
20 25 30	
Lys Gly Pro Cys Ala Val Trp Asp Asn Glu Thr Cys Arg Arg Val Cys	
35 40 45	

Lys Glu Glu Gly Arg Ser Ser Gly His Cys Ser Pro Ser Leu Lys Cys
50 55 60

Trp Cys Glu Gly Cys
65

2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

 - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN Oligonucléotide Synthétique 1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2.

AATTCCCCGAA GACGACATGC AGATCAAAGT

26

2) INFORMATION POUR LA SEO ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

 - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN Oligonucléotide Synthétique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:8.

GGGCTTCTGC TGTACGTCTA GTTC

25

2) INFORMATION POUR LA SEO ID NO: 6

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

 - (A) LONGUEUR: 100 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN Oligonucléotide Synthétique 2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:s.

GAGAGATCCC CCGCGGTGGT GACTGCCTGT CCCCCAGCTA CAGCCGCTCCG TGTGCGGCTT

60

GGGACAAACGA GACCTGTCGT CGTGTGTGCA ACCGAGGAGCC

100

2) INFORMATION POUR LA SEO ID NO:10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

 - (A) LONGUEUR: 100 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN Oligonucléotide Synthétique 3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:10:

GCGCGCGGAT CCTTAGCATC CTTCGCACCA GCACTTCAGA CTGGGGCTGC AGTGGCCACT

60

GGAGCGTCCC TCCTCCTTGC ACACACGACG

100

2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(vi) SOURCE D'ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucléotide Synthétique 4

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:11:

AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCGAATTG GAGCTCGGTA CCCGGGGATC

60

CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC

85

2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 66 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN Oligonucléotide Synthétique 5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:12:

CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC

60

TAGAGG

66

2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN Oligonucléotide Synthétique 6

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:13:

CGGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT	60
GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG	93

2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN Oligonucléotide Synthétique 7

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:14:

CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGCC	60
GCGTTAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG	93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/FR 98/01462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/62 C07K14/435 C12N15/12 A01H5/00
A01N63/00

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	P. FELHBAUM ET AL.,: "Insect immunity. Septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, 1994, pages 33159-33163, XP002061373 BETHESDA, MD, US cited in the application see the whole document ---	1-11, 13, 15-24, 27, 29, 31-33
Y	EP 0 507 698 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 October 1992 cited in the application see example 1 ---	1-11, 13, 15-24, 27, 29, 31-33 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 1998

Date of mailing of the international search report

03/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No	PCT/FR 98/01462
-------------------------	-----------------

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 725 992 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 26 April 1996 cited in the application see the whole document ---	1-10
A	WO 96 03522 A (DEMETER BIOTECH LTD) 8 February 1996 see page 6, line 30 - page 7, line 13 ---	1,12,15, 19-23, 25,26
A	EP 0 508 909 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 14 October 1992 cited in the application see the whole document ---	1,11,13, 15-17, 19-24, 27,29
A	WO 91 19738 A (HOECHST AG) 26 December 1991 see the whole document ---	1,19-26
A	WO 93 19188 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 30 September 1993 see page 5, line 5-37 see page 7, line 7-15 ---	1,15,16, 19-26
A	WO 95 14098 A (BIOTECHNOLOGY RES & DEV) 26 May 1995 see abstract ---	1,9,10, 19
A	H. LEE ET AL.,: "Structure and expression of ubiquitin genes of Drosophila melanogaster" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 8, no. 11, 1988, pages 4727-4735, XP000644354 WASHINGTON, DC, US see the whole document -----	12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01462

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0507698	A 07-10-1992	FR 2673642 A		11-09-1992
		AU 652417 B		25-08-1994
		AU 1144392 A		10-09-1992
		CA 2061835 A		06-09-1992
		JP 5076369 A		30-03-1993
		MX 9200916 A		01-09-1992
		US 5491288 A		13-02-1996
		US 5792930 A		11-08-1998
FR 2725992	A 26-04-1996	NONE		
WO 9603522	A 08-02-1996	AU 3199595 A		22-02-1996
		AU 3199695 A		22-02-1996
		CA 2195625 A		08-02-1996
		EP 0781347 A		02-07-1997
		JP 10507069 T		14-07-1998
		WO 9603519 A		08-02-1996
EP 0508909	A 14-10-1992	FR 2673643 A		11-09-1992
		AT 169338 T		15-08-1998
		AU 652610 B		01-09-1994
		AU 1144292 A		10-09-1992
		CA 2061636 A		06-09-1992
		DE 69226466 D		10-09-1998
		EP 0879891 A		25-11-1998
		ES 2118802 T		01-10-1998
		IL 101115 A		10-01-1997
		JP 5095789 A		20-04-1993
		MX 9200915 A		01-09-1992
		US 5510471 A		23-04-1996
		US 5633448 A		27-05-1997
WO 9119738	A 26-12-1991	AT 118788 T		15-03-1995
		DE 59104720 D		30-03-1995
		DK 535060 T		17-07-1995
		EP 0535060 A		07-04-1993
		ES 2071319 T		16-06-1995
		GR 3015741 T		31-07-1995
		JP 6500074 T		06-01-1994
		US 5589624 A		31-12-1996
		US 5824874 A		20-10-1998
		US 5421839 A		06-06-1995
WO 9319188	A 30-09-1993	AU 676471 B		13-03-1997
		AU 3751393 A		21-10-1993
		CA 2132323 A		30-09-1993
		EP 0631629 A		04-01-1995
		JP 7506485 T		20-07-1995
		US 5723760 A		03-03-1998
		US 5750874 A		12-05-1998
WO 9514098	A 26-05-1995	AU 687961 B		05-03-1998
		AU 1288595 A		06-06-1995
		BR 9408093 A		12-08-1997
		CN 1136825 A		27-11-1996
		EP 0729514 A		04-09-1996
		JP 9505205 T		27-05-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 98/01462

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 6	C12N15/82	C12N15/62	C07K14/435	C12N15/12	A01H5/00 A01N63/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIE

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	P. FELHBAUM ET AL.,: "Insect immunity. Septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, 1994, pages 33159-33163, XP002061373 BETHESDA, MD, US cité dans la demande voir le document en entier ---	1-11, 13, 15-24, 27, 29, 31-33
Y	EP 0 507 698 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 octobre 1992 cité dans la demande voir exemple 1 ---	1-11, 13, 15-24, 27, 29, 31-33
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la liste des documents

Les documents et familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent;
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle ou indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'émission du présent rapport de recherche internationale
26 novembre 1998	03/12/1998
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office European des Brevets, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 98/01462

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 725 992 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 26 avril 1996 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-10
A	WO 96 03522 A (DEMETER BIOTECH LTD) 8 février 1996 voir page 6, ligne 30 - page 7, ligne 13 ---	1,12,15, 19-23, 25,26
A	EP 0 508 909 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 14 octobre 1992 cité dans la demande voir le document en entier ---	1,11,13, 15-17, 19-24, 27,29
A	WO 91 19738 A (HOECHST AG) 26 décembre 1991 voir le document en entier ---	1,19-26
A	WO 93 19188 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 30 septembre 1993 voir page 5, ligne 5-37 voir page 7, ligne 7-15 ---	1,15,16, 19-26
A	WO 95 14098 A (BIOTECHNOLOGY RES & DEV) 26 mai 1995 voir abrégé ---	1,9,10, 19
A	H. LEE ET AL.,: "Structure and expression of ubiquitin genes of Drosophila melanogaster" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 8, no. 11, 1988, pages 4727-4735, XP000644354 WASHINGTON, DC, US voir le document en entier -----	12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale N°
PCT/FR 98/01462

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0507698 A	07-10-1992	FR 2673642 A AU 652417 B AU 1144392 A CA 2061835 A JP 5076369 A MX 9200916 A US 5491288 A US 5792930 A	11-09-1992 25-08-1994 10-09-1992 06-09-1992 30-03-1993 01-09-1992 13-02-1996 11-08-1998
FR 2725992 A	26-04-1996	AUCUN	
WO 9603522 A	08-02-1996	AU 3199595 A AU 3199695 A CA 2195625 A EF 0781347 A JP 10507069 T WO 9603519 A	22-02-1996 22-02-1996 08-02-1996 02-07-1997 14-07-1998 08-02-1996
EP 0508909 A	14-10-1992	FR 2673643 A AT 169338 T AU 652610 B AU 1144292 A CA 2061636 A DE 69226466 D EP 0879891 A ES 2118802 T IL 101115 A JP 5095789 A MX 9200915 A US 5510471 A US 5633448 A	11-09-1992 15-08-1998 01-09-1994 10-09-1992 06-09-1992 10-09-1998 25-11-1998 01-10-1998 10-01-1997 20-04-1993 01-09-1992 23-04-1996 27-05-1997
WO 9119738 A	26-12-1991	AT 118788 T DE 59104720 D DK 535060 T EF 0535060 A ES 2071319 T GR 3015741 T JF 6500074 T US 5589624 A US 5824874 A US 5421839 A	15-03-1995 30-03-1995 17-07-1995 07-04-1993 16-06-1995 31-07-1995 06-01-1994 31-12-1996 20-10-1998 06-06-1995
WO 9319188 A	30-09-1993	AU 676471 B AU 3751393 A CA 2132323 A EF 0631629 A JP 7506485 T US 5723760 A US 5750874 A	13-03-1997 21-10-1993 30-09-1993 04-01-1995 20-07-1995 03-03-1998 12-05-1998
WO 9514098 A	26-05-1995	AU 687961 B AU 1288595 A BR 9408093 A CN 1136825 A EP 0729514 A JP 9505205 T	05-03-1998 06-06-1995 12-08-1997 27-11-1996 04-09-1996 27-05-1997

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

This Page Blank (uspto)